

RNAi 技术在昆虫功能基因研究中的应用进展

杨中侠^{1,2}, 文礼章², 吴青君¹, 王少丽¹, 徐宝云¹, 张友军^{1,*}

(1. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; 2. 湖南农业大学生物安全科学技术学院, 长沙 410128)

摘要: RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指外源或内源的双链 RNA(dsRNA)特异性地引起基因表达沉默的现象, 它作为一种有效的工具用来产生转录后沉默, 从而抑制特定基因的表达, 成为基因功能研究的一种新方法, 除了在模式昆虫如果蝇 *Drosophila* 中广泛应用之外, 也在非模式昆虫中得到成功应用。近年来, RNAi 技术在导入方法和基因功能分析方面都取得了飞速发展, 且与转基因技术相结合成功应用于害虫防治领域。本文综述了 RNAi 技术在导入方法、昆虫功能基因组功能分析及害虫防治等领域新近的研究成果, 并展望了该技术的应用前景。

关键词: RNA 干扰(RNAi); 双链 RNA(dsRNA); 昆虫; 基因功能; 应用

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2008)10-1077-06

Application of RNA interference in studying gene functions in insects

YANG Zhong-Xia^{1,2}, WEN Li-Zhang², WU Qing-Jun¹, WANG Shao-Li¹, XU Bao-Yun¹, ZHANG You-Jun^{1,*} (1. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 2. College of Biosafety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: RNA interference (RNAi) is a kind of phenomenon that *in vitro* or *in vivo* dsRNA induced knockdown of gene expression. RNAi as one of the most promising techniques to knockdown the expression of corresponding gene has been extensively used for sequence-specific loss of gene function in model insects like *Drosophila* and also in non-model insects. The methods to introduce dsRNA and the functional analysis of gene have been frequently developed, and RNAi technique combined with transgenic technique has been applied to control agricultural pests in recent years. In this review, we described the application and prospect of RNAi technique in studying gene functions in insects and in pest management.

Key words: RNA interference (RNAi); double-stranded RNA (dsRNA); insect; gene function; application

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指外源或内源的双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)特异性地引起基因表达沉默的现象。这种现象是生物为保护自身基因组免受外源性(如病毒)和内源性(如转座元件)序列的侵袭, 而特异性地调节或干扰基因表达的一种自身防御“免疫”应答现象。RNAi 系统具有稳定转座子、清除异常 RNA、调节基因表达等功能, 且 RNAi 沉默基因的高效率、高特异性以及能在细胞内进行人工诱导, 使 RNAi 作为一种反向遗传技术广泛应用于基因功能的研究, 利用 RNAi 技术研究生物的基因功能已成为生物技术领域的有力手段(Plasterk, 1998)。本文简要介绍近年来 RNAi

技术在导入方式、昆虫基因功能研究及害虫防治中的应用等方面取得的最新研究成果。

1 昆虫 RNAi 的导入方法

目前对昆虫进行 RNAi 的操作技术已经比较成熟, 将 dsRNA 或 siRNA 导入昆虫体内主要有 3 种方法, 即注射、饲喂和组织培养。每种方法都各有其优缺点, 因而根据用途选择最佳方式是有必要的。

1.1 注射法

将体外合成的 dsRNA 通过微量操作仪注射到昆虫体内, 是目前应用最普遍的导入方法(Ober and

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(“973”计划)项目(2006CB102000); 国家自然科学基金项目(30471159, 30270900)

作者简介: 杨中侠, 女, 1978 年生, 黑龙江人, 讲师, 主要从事昆虫分子生态学研究, E-mail: yzxmichelle@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: zhangyj@mail.caas.net.cn

收稿日期 Received: 2007-10-30; 接受日期 Accepted: 2008-09-11

Jockusch, 2006)。Kennerdell 和 Carthew (1998) 用显微注射的方法将果蝇 *Drosophila* 的与翅形成有关基因 (*frizzled* 和 *frizzled 2*) 的 dsRNA 注入胚胎中, 分别得到这两个基因的缺陷型, 首次实现了用 RNAi 技术来研究昆虫基因的功能。继 RNAi 技术在果蝇的成功应用之后, 在昆虫胚胎中通过人工介导的方式引入 dsRNA, 产生缺陷型个体来研究基因的功能已被越来越多的昆虫学家所应用。Brown 等 (1999) 首次将 RNAi 技术应用于非模式昆虫赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 中, 探讨了 RNAi 技术应用于非模式昆虫中及研究不同生物发育机制的可行性。通过将目标基因的 dsRNA 注射到胚胎, 成功验证了半翅目、鳞翅目和直翅目等某些昆虫基因的功能 (Hughes and Kaufman, 2000; Fabrick *et al.*, 2004; Miyawaki *et al.*, 2004)。

dsRNA 可以注射到昆虫的任何部位, 但通常位于前胸和腹部。进入体内后, dsRNA 很容易在体内扩散引起 RNAi, 甚至可能将这种效应传递到子代。由于产生的缺陷型外显率高, 这种方法非常适合胚胎基因的功能研究。注射法的局限性体现在需体外合成 dsRNA 和微量注射操作上的难度。目前, 试剂盒的涌现为体外合成 dsRNA 提供了极大方便, 但微量注射是一项较难掌握的技术。虫体较大的昆虫在注射 dsRNA 后, 伤口易愈合, 成活率较高, 目前已在鳞翅目的烟草天蛾 *Manduca sexta* (Levin *et al.*, 2005; Soberon *et al.*, 2007)、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (Rajagopal *et al.*, 2002) 和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Sivakumar *et al.*, 2007) 等虫体内建立了通过注射 dsRNA 诱导 RNAi 的体系, 笔者针对虫体相对较小的小菜蛾 *Plutella xylostella* 也成功建立了微量注射 dsRNA 的技术。虫体很小的昆虫, 在注射难度加大的同时, 成活率也相对较低。Ghanima 等 (2007) 首次将对烟粉虱 *Bemisia tabaci* 的 2 日龄成虫进行 dsRNA 注射, 成活率仅在 50% ~ 60%; 对豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 成虫注射目标基因的 siRNA 的实验也证明, 靶基因的 RNAi 导致了豌豆蚜的死亡 (Mutti *et al.*, 2006)。由于操作的局限性, 导致了注射法很难用于大规模分析。

1.2 饲喂法

根据昆虫可取食人工饲料的特点, 又发展了另一种 dsRNA 导入方法即饲喂法。继 Turner 等 (2006) 首次证明 RNAi 技术不仅能通过注射也可通过饲喂来实现后, 目前该方法已成功应用于长红锥蝽 *Rhodnius prolixus* (Araujo *et al.*, 2006)、棉铃虫 (Mao

et al., 2007) 和玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Baum *et al.*, 2007) RNAi 的研究。通过饲喂表达 dsRNA 的作物、人工饲料或菌株, 使大量的昆虫连续摄入 dsRNA, 在增加目标昆虫成活率的同时, 还可有效抑制靶基因的表达。因此, 如能建立一个 RNAi 喂养菌株文库, 该方法就可高效地分析大批基因的功能。同时, 菌株能反复培养, 极大地降低研究成本。目前, 饲喂法成功沉默了在昆虫中肠表达的基因 (Baum *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2007), 但 dsRNA 饲喂后, 通过肠道上皮细胞的吸收, dsRNA 能否到达其他靶基因所表达的细胞或组织以实现沉默是值得进一步研究的课题。

1.3 组织培养法

组织培养法是将 dsRNA 混合入培养基, 昆虫细胞可直接从培养基中吸收 dsRNA, 而发生 RNAi 的一种方法。美国科学家 Caplen 等 (2000) 首先对模式昆虫果蝇的体细胞进行了 RNAi 的尝试, 通过组织培养将 dsRNA 导入果蝇组织细胞 Schneider 2 (S2) 中, 成功抑制了外源基因 GFP 的表达, 且该细胞转染对细胞本身的生长并无影响, 外源 dsRNA 对果蝇体内其他非目标基因的表达也无影响, 证明了组织培养在导入 dsRNA 中的可行性。随后, 白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 和埃及伊蚊 *A. aegypti* 的离体细胞, 也被应用于研究基因功能 (Caplen *et al.*, 2002; Travantya *et al.*, 2004)。该方法因培养基的培养条件较难掌握, 不易培养出符合要求的细胞而发展较慢。

2 RNAi 在昆虫中的应用

通过导入 dsRNA 干扰昆虫体内内源基因的表达, 从而根据基因缺失的拟表型研究此基因功能, 该方法已为越来越多的昆虫研究者所掌握, 多种昆虫基因的功能也逐渐被确定。

2.1 完全变态类昆虫 RNAi 的应用

RNAi 技术在昆虫中的应用始于双翅目的果蝇, 并得到发展, 目前已建立了两个果蝇的 RNAi 基因文库, 其中一个文库收集了 22 270 个转基因果蝇品系, 另外一个文库包括了 13 000 个果蝇品系, 这两个文库的结合将会极大地加强果蝇全基因组的研究 (Ledford, 2007)。比如, 科学家们利用 RNAi 技术研究果蝇的交配行为, 已明确了体内缺少 Genderblind 蛋白的雄性果蝇, 不能正确选择配偶 (Grosjean *et al.*, 2007); 雄性果蝇释放的性肽 (sex peptide, SP) 在雌性体内有受体, 进而在交配过程中可发挥一定的

作用(Yapici *et al.*, 2008)。RNAi 对于双翅目蚊类的应用始于对冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 抗菌肽基因 Defensin 功能的鉴定,该技术为体内研究蚊子的基因功能开辟了新篇章(Blandin *et al.*, 2002);目前,应用 RNAi 技术已证明沉默淡色库蚊 *Culex pipiens* 的胰岛素可以激活体内 FOXO (forkhead transcription factor)的下游基因,从而导致滞育;由此表明,昆虫中有一种调控睡眠的保守机制(Sim and Denlinger, 2008)。

膜翅目昆虫中, RNAi 技术应用最多的是意大利蜜蜂 *Apis mellifera*。Gatehouse 等(2004)证明,在意大利蜜蜂成虫腹部注射亲缘关系较远器官的基因的 dsRNA 也能降低基因的表达;同时,该虫的免疫基因 *Relish* 的功能也通过 RNAi 技术被证实(Schlüns and Crozier, 2007)。在鳞翅目昆虫中, RNAi 技术的应用主要体现为在幼虫期对某个基因进行干扰以研究其功能。如在烟草天蛾幼虫期对 *cadherin* 基因进行干扰,证明了该基因为 Bt 毒素 Cry1Ab 和 Cry1A 的受体等(Soberon *et al.*, 2007)。

科学家们将 RNAi 技术应用到鞘翅目昆虫的各个发育阶段,将不同时期的干扰效果进行比较,并发现了一些规律。如对赤拟谷盗进行幼虫期、蛹期和成虫期的注射干扰实验表明,注射时期不同,干扰效果也不同,在基因高表达时期到来之前注射相应 dsRNA 的干扰效果最好(Arakane *et al.*, 2005)。目前,应用 RNAi 技术已经鉴定了赤拟谷盗几丁质酶基因 *TcCHT5*, *TcCHT10*, *TcCHT7* 和 *TcIDGF4* 的功能,这些几丁质酶家族基因功能的鉴定,为类几丁质酶蛋白的分类提供了生物学原理(Zhu *et al.*, 2008)。

2.2 不完全变态类昆虫 RNAi 的应用

在完全变态昆虫的 RNAi 技术应用比较成熟的情况下,该技术也被成功应用于不完全变态的昆虫中。将 RNAi 技术应用于直翅目的南美沙漠蝗 *Schistocerca americana* 研究与复眼颜色形成有关的基因 *vermilion* 的功能时,在其成虫初期得到长期持续的基因沉默(long-term gene silencing)。这种整个虫体 RNAi 的保守性,表明该方法能用于大多数昆虫成虫期基因的特定分析(Dong and Friedrich, 2005)。直翅目昆虫双斑蟋 *Gryllus bimaculatus* 的 *sulfakinin* (SK)基因的功能也通过 RNAi 的方法成功地被验证(Meyering-Vos and Muller, 2007)。Cruz 等(2006)以德国小蠊 *Blattella germanica* 为研究对象,证明了蜕皮激素受体 BgEcR-A 是成虫特异发育过程如翅的发

育,前胸腺的退化和正常发育所必需的。等翅目昆虫北美散白蚁 *Reticulitermes flavipes* 的 *Hex-1* 和 *Hex-2* 基因的功能也通过注射 siRNA 的方法被验证,证实这两个基因均参与了北美散白蚁非遗传多型性的调控(Zhou *et al.*, 2006)。

2.3 病毒表达载体及细菌参与的 RNAi 技术

RNAi 是生物体用来抵御病毒和外源基因的入侵的一种遗传机制,而病毒也可作为载体参与目标基因的沉默,并在昆虫体内实现对外源病毒基因的干扰。Uhlirova 等(2003)利用重组子 Sindbis 病毒沉默家蚕 *Bombyx mori* 中 *BR-C* 基因的实验,证明了病毒可以作为一种有用的工具来沉默发育基因。RNAi 技术和 Sindbis 病毒表达系统相结合,成功地鉴定了埃及伊蚊的卵黄蛋白原(vitellogenin, Vg)的受体 AaGATAr 的功能(Attardo *et al.*, 2003)。

发光杆菌属细菌能产生小分子的抗生素(E)1, 3-dihydroxy-2-(isopropyl)-5-(2-phenylethenyl) benzene (ST), 可作为寄主昆虫烟草天蛾体内酚氧化酶(phenoloxidase, PO)的抑制剂,利用 RNAi 方法证明 ST 既可作为 PO 抑制剂来躲避寄主的免疫反应,又可作为抗生素拮抗来自于昆虫尸体的细菌的双重作用(Eleftherianos *et al.*, 2007)。

3 昆虫 RNAi 的可遗传性

通过人工注射方式介导产生的 RNAi,从效果产生到完全检测不到效果只有几天到十几天的时间,其作用效果随着时间的延长而减弱,理论上似乎是一种瞬时的效应,但很多研究结果证明 RNAi 的效果是可传递的。

3.1 亲本 RNAi (partenel RANi)

科学家将雌性蛹期 RNAi 的效果可传递到下一代的现象称为亲本 RNAi,其传递性是指从母本类似于胞质遗传的方式遗留给子代。Bucher 等(2002)将赤拟谷盗足上的一个独立基因 *Tribolium giant homologue* 的 dsRNA 注射到蛹中,蛹羽化后,将注射 dsRNA 的雌虫和雄虫分别与正常雌、雄虫交配,结果注射 dsRNA 的雌蛹产生的后代均有干扰表型,而注射后的雄蛹的后代无干扰表型,证实了 RNAi 的效果可传递到下一代。亲本 RNAi 极大地促进了利用 RNAi 技术研究与胚胎发生有关的基因的功能(Copf *et al.*, 2004)。亲本 RNAi 在膜翅目(Amdam *et al.*, 2003; Lynch and Desplan, 2006)、半翅目(Liu and Kaufman, 2004)及直翅目(He *et al.*, 2006)中的一些

昆虫中相继被证实。

3.2 可遗传的 RNAi (heritable RNAi)

可遗传的 RNAi 指用转基因的手段将表达双链的反向重复序列(中间用内含子隔开)整合到昆虫染色体上。果蝇胚胎时期 RNAi 的效果能够持续到整个胚胎发育阶段(Kennerdell and Carthew, 1998; Misquitta and Paterson, 1999),而在成虫时期对基因的干扰似乎大大减少(Misquitta and Paterson, 1999),果蝇的 RNAi 效应除了具有瞬时性的特点之外,而且注射 dsRNA 诱导的 RNAi 在孟德尔法则上并不是可遗传的,导致实验操作中要针对每个个体进行分析,收集数据费时费力。为克服这个难题,Piccin 等(2001)发展了可调控的遗传 RNAi 方法,成功地对果蝇实现了可持续的基因沉默。Kanginakudru 等(2007)将可遗传的 RNAi 应用于鳞翅目的家蚕中,成功实现了 *early-1* (*ie-1*)基因的持续沉默,并阻止了家蚕免受病毒的侵染,该技术为养蚕业的发展做出了巨大贡献。

4 RNAi 在害虫防治领域中的应用

RNAi 一直广泛应用于基因功能的研究,在利用该技术成功鉴定了多种昆虫基因功能的同时,科学家们试图将该技术应用于害虫防治领域,目前已在鳞翅目和鞘翅目昆虫中试验成功。通过对棉铃虫幼虫饲喂表达 P450 基因(CYP6AE14)和谷胱甘肽基因 *GST1* dsRNA 的棉花,诱导 RNAi 并阻碍了幼虫发育,这一技术为田间害虫控制开辟了新领域(Mao *et al.*, 2007); Baum 及其同事利用含特定 dsRNA 的人工饲料饲喂玉米根萤叶甲,沉默了其 14 个特定基因,该 RNAi 为利用表达 Bt 毒素蛋白的玉米、棉花和大豆等作物来控制害虫,提供了一个独特的模式(Baum *et al.*, 2007)。

通过饲喂表达 dsRNA 的作物来沉默特定基因进而控制害虫,为农业害虫防治领域开辟了一个新的空间。但该技术的应用也存在一定的风险,如该技术对昆虫体内所有解毒基因的有效性、对除鳞翅目和鞘翅目以外的昆虫的有效性以及昆虫种群的多型现象对该 RNAi 技术的影响等。且该技术目前仅在实验室取得成功,能否成功应用于大田尚待进一步研究。尽管存在这些风险,但科学家们仍对该技术在害虫防治中的应用抱有很大期望。

5 小结与展望

RNAi 作为一种新的特异性体内基因表达的抑制机制,为利用反向遗传学方法大规模研究未知基因的功能提供了一个具有可操作性的技术平台,成为研究基因功能的最有用的工具。除了在各种模式生物中的应用以外, RNAi 在昆虫中将会有更大的应用前景。首先, RNAi 已成为研究基因功能的新工具,果蝇的全部基因组序列已测试完毕,发现大量未知功能的新基因, RNAi 将大大促进对这些新基因功能的研究。其次, RNAi 技术较传统实验简单、快速、重复性好,克服了转染实验中重组蛋白特异性聚集和转染效率不高的缺点,因此, RNAi 技术可能成为研究细胞信号传导通路的新途径。此外, RNAi 具有抵抗病毒入侵,抑制转座子活动,防止自私基因序列过量增值等作用,故可利用 RNAi 现象产生抗病毒的植物和动物,并可利用不同病毒转录序列中高度同源区段相应的 dsRNA 抵抗多种病毒,既而成为开展基因治疗的新策略。只要解决了技术上的难题,便可以应用 RNAi 技术产生大量的缺陷型个体,并对大量的拟表型的缺陷型进行生化分析,从而进一步运用到昆虫体内的其他基因,及更为深层精细的组织系统如神经系统等的研究。通过饲喂表达特定基因 dsRNA 的作物而实现 RNAi,不仅对降低害虫的抗药性有很大的帮助,且对害虫防治也开辟了一条新路。

尽管 RNAi 技术还有很多的不足和缺陷尚未解决,比如采用 RNAi 技术的前提是目的基因序列必须已知,当然,随着基因组和 EST 测序计划的增加,受序列方面的限制将会减少;其次, dsRNA 的呈递方法也限制了高通量方法的应用,限制了目标基因的稳定抑制。但由于 RNAi 技术的巨大优势以及与其他技术相比的低依赖性和省时性,必将受到越来越多的关注。

参考文献 (References)

Amdam GV, Simões ZLP, Guidugli KR, Norberg K, Omholt SW, 2003. Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnol.*, 3: 1-8.

Arakane Y, Muthukrishnan S, Kramer KJ, Specht CA, Tomoyasu Y, Lorenzen MD, Kanost M, Beeman RW, 2005. The *Tribolium* chitin synthase genes *TcCHS1* and *TcCHS2* are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. *Insect Mol. Biol.*,

- 14: 453–463.
- Araujo RN, Santos A, Pinto FS, Gontijo NF, Lehane MJ, Pereira MH, 2006. RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36: 683–693.
- Attardo GM, Higgs S, Klingler KA, Vanlandingham DL, Raikhel AS, 2003. RNA interference-mediated knockdown of a GATA factor reveals a link to anautogeny in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 13 374–13 379.
- Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, Johnson S, Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M, Vaughn T, Roberts J, 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotechnol.*, 25(11): 1 322–1 326.
- Blandin S, Moita LF, Köcher T, Wilm M, Kafatos FC, Levashina EA, 2002. Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: targeted disruption of the defensin gene. *EMBO Rep.*, 3(9): 852–856.
- Brown SJ, Mahaffey JP, Lorenzen MD, Denell RE, Mahaffey JW, 1999. Using RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during development of distantly related insects. *Evol. Dev.*, 1: 11–15.
- Bucher G, Scholten J, Klingler M, 2002. Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Current Biology*, 12: 85–86.
- Caplen NJ, Fleenor B, Fire A, Morgan RA, 2000. Morgan dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference. *Gene*, 252: 95–105.
- Caplen NJ, Zheng Z, Falgout B, Morgan RA, 2002. Inhibition of viral gene expression and replication in mosquito cells by dsRNA-triggered RNA interference. *Mol. Ther.*, 6: 243–251.
- Copf T, Schröder R, Averof M, 2004. Ancestral role of caudal genes in axis elongation and segmentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(51): 17 711–17 715.
- Cruz J, Mané-Padrós D, Bellés Martín D, 2006. Functions of the ecdysone receptor isoform-A in the hemimetabolous insect *Blattella germanica* revealed by systemic RNAi *in vivo*. *Dev. Biol.*, 297: 158–171.
- Dong Y, Friedrich M, 2005. Nymphal RNAi: systemic RNAi mediated gene knockdown in juvenile grasshopper. *BMC Biotechnol.*, 5: 25.
- Eleftherianos I, Boundy S, Joyce SA, Aslam S, Marshall JW, Cox RJ, Simpson TJ, Clarke DJ, French-Constant RH, Reynolds SE, 2007. An antibiotic produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defenses through phenoloxidase inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(7): 2 419–2 424.
- Fabrick JA, Kanost MR, Baker JE, 2004. RNAi-induced silencing of embryonic tryptophan oxygenase in the pyralid moth, *Plodia interpunctella*. *J. Insect Sci.*, 1–9.
- Gatehouse HS, Gatehouse LN, Malone LA, Hodges S, Tregidga E, Todd J, 2004. Amylase activity in honey bee hypopharyngeal glands reduced by RNA interference. *J. Apicult. Res.*, 43: 9–13.
- Ghanim M, Kontsedalov S, Czosnek H, 2007. Tissue-specific gene silencing by RNA interference in the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37: 732–738.
- Grosjean Y, Grillet M, Augustin H, Ferveur JF, Featherstone DE, 2007. A glial amino-acid transporter controls synapse strength and courtship in *Drosophila*. *Nat Neurosci.*, 11: 54–61.
- He ZB, Cao YQ, Yin YP, Wang ZK, Chen B, Peng GX, Xia YX, 2006. Role of hunchback in segment patterning of *Locusta migratoria manilensis* revealed by parental RNAi. *Dev. Growth Differ.*, 48: 439–445.
- Hughes CL, Kaufman TC, 2000. RNAi analysis of Deformed, proboscipedia and Sex combs reduced in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*: novel roles for Hox genes in the Hemipteran head. *Development*, 127: 3 683–3 694.
- Kanginakudru S, Royer C, Edupalli SV, Jalabert A, Mauchamp B, Prasad SV, Chavancy G, Couble P, Nagaraju J, 2007. Targeting ie-1 gene by RNAi induces baculoviral resistance in lepidopteran cell lines and in transgenic silkworms. *Insect Mol. Biol.*, 16(5): 635–644.
- Kennerdell JR, Carthew RW, 1998. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell*, 95(7): 1 017–1 026.
- Ledford H, 2007. Fly library boosts gene tool supply. *Nature*, 448: 115.
- Levin DM, Breuer LN, Zhuang S, Anderson SA, Nardi JB, Kanost MR, 2005. A hemocyte-specific integrin required for hemocytic encapsulation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35: 369–380.
- Liu PZ, Kaufman TC, 2004. *hunchback* is required for suppression of abdominal identity, and for proper germband growth and segmentation in the intermediate germband insect *Oncopeltus fasciatus*. *Dev.*, 131: 1 515–1 527.
- Lynch JA, Desplan C, 2006. A method for parental RNA interference in the wasp *Nasonia vitripennis*. *Nature Protocols*, 1: 487.
- Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY, 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat. Biotechnol.*, 25: 1 307–1 313.
- Meyering-Vos M, Müller A, 2007. RNA interference suggests sulfakinins as satiety effectors in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Insect Physiol.*, 53: 840–848.
- Misquitta L, Paterson BM, 1999. Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): A role for *nautilus* in embryonic somatic muscle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(4): 1 451–1 456.
- Miyawaki K, Mito T, Sarashina I, Zhang H, Shinmyo Y, Ohuchi H, Noji S, 2004. Involvement of Wingless/Armadillo signaling in the posterior sequential segmentation in the cricket, *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera), as revealed by RNAi analysis. *Mech. Dev.*, 121: 119–130.
- Mutti NS, Park Y, Reese JC, Reek GR, 2006. RNAi knockdown of a salivary transcript leading to lethality in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Sci.*, 6: 38.
- Ober KA, Jockusch EL, 2006. The roles of wingless and decapentaplegic in axis and appendage development in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Dev. Biol.*, 294(2): 391–405.
- Piccin A, Salameh A, Benna C, Sandrelli F, Mazzotta G, Zordan M, Rosato E, Kyriacou CP, Costa R, 2001. Efficient and heritable functional knock-out of an adult phenotype in *Drosophila* using a GAL4-driver hairpin RNA incorporating a heterologous spacer. *Nucl. Acids Res.*, 29

- (12): E55.
- Plasterk R, 1998. V(D)J recombination: Ragtime jumping. *Nature*, 394: 718–719.
- Rajagopal R, Sivakumar S, Agrawal N, Malhotra P, Bhatnagar RK, 2002. Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *J. Biol. Chem.*, 277: 46 849–46 851.
- Schlüns H, Crozier RH, 2007. Relish regulates expression of antimicrobial peptide genes in the honeybee, *Apis mellifera*, shown by RNA interference. *Insect Mol. Biol.*, 16: 753–759.
- Sim C, Denlinger DL, 2008. Insulin signaling and FOXO regulate the overwintering diapause of the mosquito *Culex pipiens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(18): 6 777–6 781.
- Sivakumar S, Rajagopal R, Venkatesh GR, Srivastava A, Bhatnagar RK, 2007. Knockdown of aminopeptidase-N from *Helicoverpa armigera* larvae and in transfected Sf21 cells by RNA interference reveals its functional interaction with *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein Cry1Ac. *J. Boil. Chem.*, 282: 7 312–7 319.
- Soberón M, López LP, López I, Gómez I, Tabashnik BE, Bravo A, 2007. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science*, 318: 1 640–1 642.
- Travanty EA, Adelman ZN, Franz AWE, Keene KM, Beaty BJ, Blair CD, James AA, Olson KE, 2004. Using RNA interference to develop dengue virus resistance in genetically modified *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(7): 607–613.
- Turner CT, Davy MW, MacDiarmid RM, Plummer KM, Birch NP, Newcomb RD, 2006. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Mol. Biol.*, 15: 383–391.
- Uhlirova M, Foy BD, Beaty BJ, Olson KE, Riddiford LM, Jindra M, 2003. Use of Sindbis virus-mediated RNA interference to demonstrate a conserved role of Broad-Complex in insect metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 15 607–15 612.
- Yapici N, Kim YJ, Ribeiro C, Dickson BJ, 2008. A receptor that mediates the post-mating switch in *Drosophila* reproductive behaviour. *Nature*, 451: 33–37.
- Zhou X, Oi FM, Scharf ME, 2006. Social exploitation of hexamerin: RNAi reveals a major caste-regulatory factor in termites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 4 499–4 504.
- Zhu Q, Arakane Y, Beeman RW, Kramer KJ, Muthukrishnan S, 2008. Functional specialization among insect chitinase family genes revealed by RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(18): 6 650–6 655.

(责任编辑: 赵利辉)